

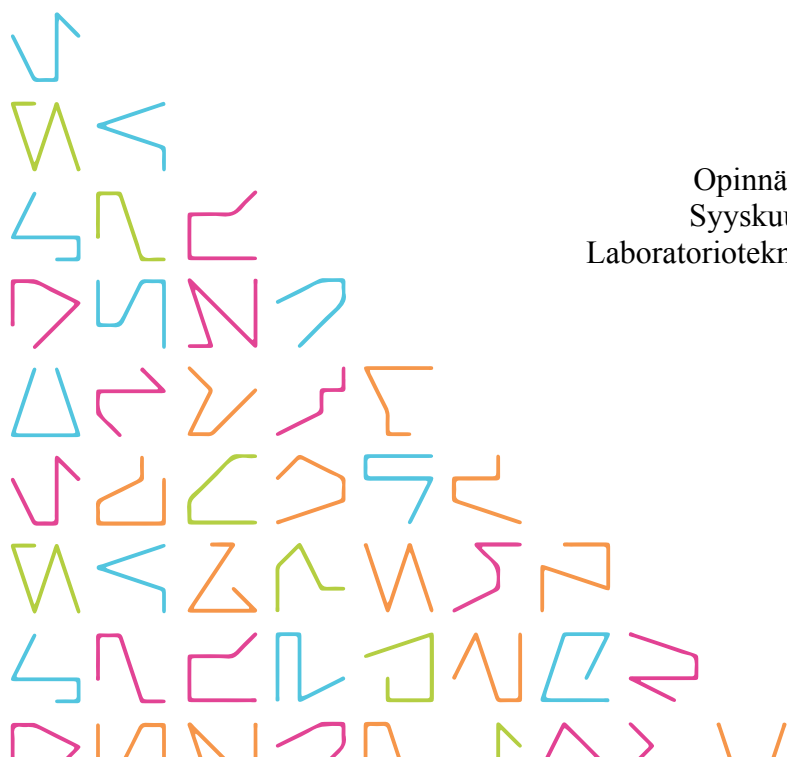


TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

SOKERIPITOISUUDEN IONIKROMATOGRAFINEN MÄÄRITYS – MENETELMÄKEHITYS JA VALIDOINTI

Ruusa Eloniemi

Opinnäytetyö
Syyskuu 2016
Laboratoriotekniikan koulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikan koulutus

ELONIEMI, RUUSA:

Sokeripitoisuuden ionikromatografinen määrittäminen – menetelmäkehitys ja validointi

Opinnäytetyö 35 sivua
Syyskuu 2016

Monissa elintarvikkeissa jo oleva ravintoarvomerkintä tulee pakolliseksi pakattuihin elintarvikkeisiin 13.12.2016 alkaen. Tämä merkintä sisältää hiilihydraattien määrän grammoina 100 elintarvikegrammaa kohden, sekä sokerien osuuden hiilihydraateista grammoina. Tavoitteena opinnäytetyössä oli kehittää ja validoida Nablabs Oy:lle menetelmä sokerien määrittämiseksi elintarvikkeista ionikromatografilla. Tavoitteena oli korvata vanha laktoosinmäärittämenetelmä uudella ja automatisoidummalla menetelmällä virheen mahdollisuuden pienentämiseksi.

Opinnäytetyön tarkoitus oli saada kehitettyä toimiva menetelmä, jolla voidaan luotettavasti arvioida viiden eri sokerin pitoisuuksia näytteessä ravintoarvomerkintää varten. Arvioitavat sokerit olivat glukoosi, fruktoosi, sakkaroosi, laktoosi ja maltoosi. Validoinnin tärkein tarkoitus oli päästä määrittämissä Eviran asettaman laktoosittomuuden rajan alle, joka on 10 milligrammaa laktoosia 100 grammassa näytettä. Muita validoitavia ominaisuuksia olivat laitteen stabiilisuus, toistettavuus ja tarkkuus, mittausepävarmuus sekä lineaarisuus.

Työn tuloksena on menetelmä, jolla kaikki viisi sokeria saatiin erotettua samalla ajomenetelmällä alle puolessa tunnissa. Lisäksi validoinnilla päästiin Eviran asettaman laktoosittomuuden rajan alapuolelle. Sokerille saatiin lineaariset kalibrointikäyrät, joiden korrelaatiokerroin oli vähintään 0,999. Laite oli sisäisesti tarkka ja sen toistettavuus oli erittäin hyvä. Laite pysyi stabiilina pitkään ja mittaustulokset olivat vertailtavissa keskenään. Mittausepävarmuudet pysyivät laboratorion asettamissa rajoissa.

Tulosten perusteella menetelmä sopii sellaisenaan sokerien määrittämiseen elintarvikenäytteistä. Mikäli menetelmään halutaan jatkossa lisätä kuudes sokeri, galaktoosi, vaatii menetelmä vielä lisää kehitystä. Tulevaisuudessa voisi tehdä lisätutkimusta näytteen esikäsittelystä ja eri käsittelytekniikoiden vaikutuksesta mittaustuloksiin. Nyt esikäsittelyyn ei kiinnitetty huomiota, vaan luotettiin spektrofotometrisen menetelmän esikäsittelyyn.

Asiasanat: ionikromatografia, sokeri, validointi, menetelmäkehitys

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Engineering

ELONIEMI, RUUSA:

Determination of Sugar Content with Ion Chromatography - Method Development and Validation

Bachelor's thesis 35 pages
September 2016

Nutrition facts labels will be mandatory in packed food supplies from 13.12.2016 on. This label includes carbohydrate which states the amount of carbohydrate per 100 grams of food supplies. The nutrition facts label also includes the sugar content of the total carbohydrate amount. The objective of the thesis was to develop a method for the determination of the total sugar amount from food supplies with ion chromatography for Nablabs Oy. Furthermore, the goal of the thesis was to replace the old spectrophotometric method with a new ion chromatography method to minimize the possibility of error.

The purpose of the thesis was to develop a working method for the reliable analysis of five different sugars and their amounts from food samples. Those five sugars are glucose, fructose, sucrose, lactose and maltose. The main goal of the validation was to be able to determine lactose from lactose-free samples at the limit of determination for lactose-free food supplies set by Evira. That limit of determination is 10 milligrams of lactose in 100 grams of food supplies. Linearity, stability, repeatability, accuracy and uncertainty of measurement were also under validation.

It was possible to develop a method with which all five sugars can be separated from each other within less than thirty minutes. The validation process was successful and the limit of determination for lactose-free samples was reached. All calibration curves were linear and they had a correlation coefficient of more than 0,999. The method had a very good internal accuracy as well as repeatability. The ion chromatography was stable and had comparable results through the whole run. The uncertainty of measurement stayed below the limits set by the laboratory.

As a result of the validation it is possible to determine all five sugars from food supplies with the same method and during one run. This method needs further development if a sixth sugar, galactose, is to be added to this method. Sample preparation could also use more research in the future. The sample preparation method used in this thesis came directly from an existing method for the determination of lactose with a spectrophotometer. The focus in this thesis, however, was not the effects of different sample preparation methods.

Key words: ion chromatography, sugar, validation, method development

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	HIILIHYDRAATIT	7
2.1	Hiilihydraattien kemiaa.....	7
2.2	Sokerit.....	7
2.2.1	Fruktoosi	8
2.2.2	Glukoosi	9
2.2.3	Sakkaroosi.....	10
2.2.1	Laktoosi.....	10
2.2.2	Maltoosi.....	11
2.3	Sokerit elintarvikkeissa.....	12
2.4	Fotosynteesi	13
2.5	Energiatuotanto	14
3	IONIKROMATOGRAFIA.....	17
3.1	Ionikromatografian toiminta.....	17
3.2	Hiilihydraattianalytiikka ionikromatografilla	21
4	MENETELMÄN VALIDOINTI.....	24
4.1	Validoinnin tavoite.....	24
4.2	Validoinnissa käytetyt parametrit	24
4.2.1	Lineaarisuus ja mittausalue	24
4.2.2	Toteamisraja ja määrittäysraja	26
4.2.3	Tarkkuus ja oikeellisuus.....	26
4.2.4	Toistettavuus ja uusittavuus	28
4.2.5	Mittausepävarmuus	28
5	POHDINTA.....	29
	LÄHTEET.....	33

LYHENTEET JA TERMIT

IC	ionikromatografi
HPAE	korkean erotuskyvyn anioninvaihtokromatografia
PAD	pulssitettu elektrokemiallinen mittaus
ECD	elektrokemiallinen detektori
NADPH / NADP ⁺	nikotiiniamididinukleotidifosfaatti
NADH / NAD ⁺	nikotiiniamididinukleotidi
ATP	adenosiinitrifosfaatti

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Nablabs Oy:lle, joka perustettiin vuonna 2003. Nablabs Oy tarjoaa monipuolisesti analyysi-, asiantuntija-, mittaus- ja näytteenottopalveluita ympäri Suomen. Yrityksen toiminta ja laatu järjestelmä perustuvat standardiin SFS-EN ISO/IEC 17025. Lisäksi monet analyysit ja menetelmät ovat akkreditoituja Suomen kansallisen akkreditointielimen FINAS:n toimesta. Nablabs Oy on myös joidenkin menetelmien osalta Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran sekä Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimean hyväksymä laboratorio. (Nablabs 2016.)

Työn tavoitteena oli kehittää menetelmä elintarvikkeiden kokonaissokeripitoisuuden arvioimiseen ionikromatografilla. Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran mukaan ravintoarvomerkinnot tulevat pakollisiksi pakattuihin elintarvikkeisiin 13.12.2016 alkaen. Ravintoarvomerkinnot sisältää hiilihydraattien määrän grammoina 100 elintarvikegrammaa kohden sekä sokerien osuus hiilihydraateista grammoina. Nämä ravintoarvotiedot perustuvat valmistajan teettämään analyysiin. (Evira 2016.)

Opinnäytetyön tarkoitus oli kehittää toimiva menetelmä viiden eri sokerin pitoisuuksien määrittämiseksi ravintoarvomerkinnot varten. Tarkastelussa olivat fruktoosi, glukoosi, sakkaroosi, laktoosi ja maltoosi.

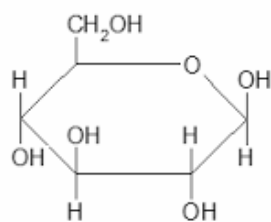
2 HIILIHYDRAATIT

2.1 Hiilihydraattien kemiaa

Hiilihydraatit voivat olla joko mono-, di- tai polysakkarideja, joille tyypillistä on stereoisomeria. Monosakkaridit ovat yksiosaisia hiilihydraatteja, kun taas disakkaridissa kaksi monosakkaridia on liittynyt toisiinsa glykosidisidoksella. Glykosidisidos muodostuu, kun anomeeriseen hiileen sitoutunut hydroksidiryhmä sitoutuu toisen hydroksidiryhmän kanssa veden eliminoituessa reaktiossa. Syntyvät polysakkaridit voivat olla suoraketjuisia tai haarautuneita riippuen siitä, mitkä hiilet ovat mukana glykosidisidoksessa. Polysakkaridi voi sisältää jopa tuhansia monosakkarideja. Lyhyemmät polysakkaridit voidaan luokitella myös oligosakkarideiksi. Nämä moniosaiset suuret hiilihydraattimolekyylit, kuten tärkkelys ja selluloosa, hajoavat ruoansulatuskanavassa entsyymien vaikutuksesta monosakkarideiksi, jotka puolestaan imeytyvät suolen seinämien läpi elimistöön. (Garrett & Grisham 2005, 204.) Hiilihydraatit käyttäytyvät heikkojen happojen tavoin ja ionisoituvat korkeissa pH-arvoissa. Sokerit ionisoituvat pH:n ollessa noin 12, kun taas sokerialkoholeilla pH:n tulee olla hieman yli 13. (El Rassi 1995, 166.)

2.2 Sokerit

Sokerit ovat hiilihydraatteja, joita esiintyy etenkin kasvikunnan tuotteissa ja ne ovat hyvin vesiliukoisia. Puhekielessä sokerista puhuttaessa tarkoitetaan yleensä sakkaroosia eli niin sanottua pöytäsokeria. Sokerit voivat koostua yhdestä tai useammasta sokeriyksiköstä. Monosakkaridit ovat sokereita, jotka sisältävät yhden sakkaridirenkaan, jossa puolestaan on viisi tai kuusi hiiliatomia (kuvio 1). Viisiatomisia sokereita kutsutaan pentooseiksi ja tunnetuimpia näistä ovat esimerkiksi DNA:n ja RNA:n rakennusaineina toimivat riboosi ja deoksiriboosi. Hedelmäsokerina tunnetulla fruktoosilla puolestaan on kuusi hiiliatomia rengasmuodossa, mikä tekee siitä heksoosin. (Garrett & Grisham 2005, 204-205.)



KUVIO 1. Galaktoosi on monosakkaridi. Sen rengasrakenteessa on kuusi hiiliatomia, joten se on heksoosi. (Chem-Guide 2016.)

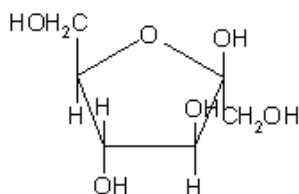
Monosakkaridit voidaan jakaa edelleen kahteen ryhmään niiden toiminnallisen ryhmän mukaan. Toiminnallinen ryhmä voi olla joko aldehydi, jolloin monosakkaridi kuuluu aldooseihin. Se voi olla myös ketoni, jolloin monosakkaridi kuuluu ketooseihin. Vaikka sokerit yleensä esiintyvätkin rengasmuotoisessa rakenteessa, on niillä luonnossa mahdollinen myös suora avoketjurakenne. Rengasrakenne muodostuu avoketjuisesta soke-rista, kun yksi sokerin hydroksyyli-ryhmistä tarttuu sokerin karbonyyli-ryhmään. Karbonyyli-ryhmän hiilestä muodostuu sokerin kiraliakeskus ja sen keskellä olevaa hiiltä nimitetään anomeeriseksi hiileksi. Anomeeriseen hiileen liittyneen hydroksidi-ryhmän sijainnin perusteella sokeri on joko α - tai β -muotoa. (Garrett & Grisham 2005, 207.)

Sokereille yleisiä ovat hapetus-pelkistysreaktiot. Hapettumista tapahtuu esimerkiksi heterofiilisten eliöiden energiatuotannossa, kun sokeri hapettuu muodostaen hiilidioksidia ja vettä. Fotosynteesissä puolestaan hiilidioksidi ja vesi pelkistyvät sokeriksi. Muita yleisiä reaktioita ovat esimerkiksi esteröitymisreaktiot sekä aminosokerien muodostuminen, kun jokin monosakkaridin hydroksidiryhmistä korvautuu aminoryhmällä tai sen johdoksella. (Garrett & Grisham 2005, 210.)

2.2.1 Fruktoosi

Fruktoosi (kuvio 2) on monosakkaridi, jonka molekyylikaava on $C_6H_{12}O_6$ ja moolimassa 180,156 g/mol. Fruktoosi on hedelmissä ja hunajassa esiintyvä erittäin makea hedelmäsokeri, jota pääasiassa käytetään makeutusaineena. Fruktoosi metabolisoituu ainoastaan maksassa. Ihmisen elimistö ei pysty käyttämään fruktoosia suoraan energialähteenä, vaan se on muutettava ensin glukooksi. Vaikka fruktoosi altistaakin monille sairauksille, kuten sydän- ja verisuonitauksille, pidetään hedelmiä silti terveellisinä. Hedelmien sisältämät kuidut hidastavat sokerien imeytymistä ja tasapainottavat näin hedelmi-

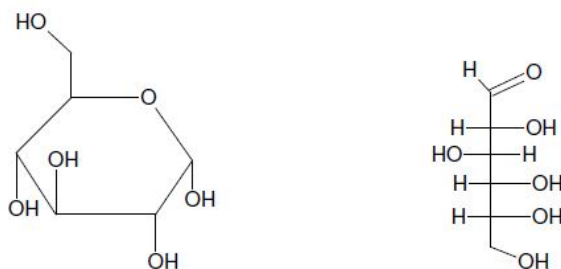
en sokerien määrää. Lisäksi hedelmät sisältävät runsaasti vitamiineja, flavonoideja ja kivennäisaineita, jotka ovat kaikki elimistölle hyödyllisiä. (Mahkonen 2008.)



KUVIO 2. Fruktosin rakennekaava (Chem-Guide 2016).

2.2.2 Glukoosi

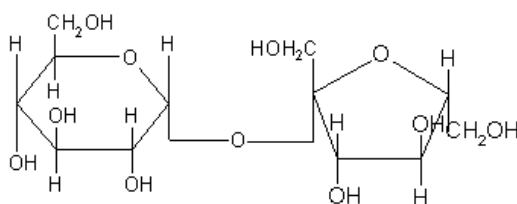
Kuviossa 3 on esitetty glukoosin eli rypälesokerin rengas- ja suoraketjuinen rakenne. Sen molekyylikaava on $C_6H_{12}O_6$ ja molekyylipaino 180,156 g/mol. Glukoosi on hyvin yleinen monosakkaridi ja se on osana useita disakkarideja, kuten laktoosia ja sakkaroosia. Kasvien yhteyttämisen lopputuotteena syntyy glukoosia, joka toimii soluhengityksen raaka-aineena. Kaikki ravinnosta saadut hiilihydraatit muutetaan elimistössä glukoosiksi, joka imeytyy verenkiertoon ja varastoidaan tarvittaessa glykokeeniksi maksaan ja lihaksiin. Glukoosi toimii energianlähteenä soluaineenvaihdunnassa. Se metaboliisoituu glykolyysissa ja sitruunahappokierrossa vedeksi ja hiilidioksidiksi, jolloin lopputuotteena saadaan adenosiinitrifosfaattiyksiköitä, joita ihminen käyttää energianaan. Paastotun yön jälkeen ihmiseltä voidaan mitata sokeriarvo, joka kertoo mahdollisesta diabeteksestä. Mittauksessa on kyse glukoosin mittaamisesta elimistön verenkierrosta. (Turunen 2007, 177.)



KUVIO 3. Glukoosin mahdolliset rakenteet. Vasemmalla α -D-glukoosin rengasmuotoinen rakenne. Oikealla D-glukoosin suoraketjuinen muoto. (Chem-Guide 2016.)

2.2.3 Sakkarooosi

Glukoosin ja fruktoosin muodostama sakkarooosi (kuvio 4) on disakkaridi, jonka molekyylikaava on $C_{12}H_{22}O_{11}$ ja molekyylipaino 342,296 g/mol. Sakkarooosista käytetään myös nimityksiä ruokosokeri ja sukroosi. Yleensä sokerista puhuttaessa tarkoitetaan sakkarooosia. Sakkarooosi on kasveissa yleinen yhdiste ja sitä esiintyy Suomessa esimerkiksi sokeriruokossa, sokerijuurikkaassa sekä porkkanassa. Tavallinen pöytäsookeri on yleensä jalostettua sokerijuurikasta eli sakkarooosia. Sakkarooosia valmistettaessa se kiitetään kasvista. Elimistöön päästyään sakkarooosi pilkkoo sakkarooosin ohutsuolessa monosakkarideiksi. Makeuttamisen ja säilömisen lisäksi sakkarooosia voidaan käyttää solunulkoisen nestetilan mittauksessa. (Dansukker 2016.)

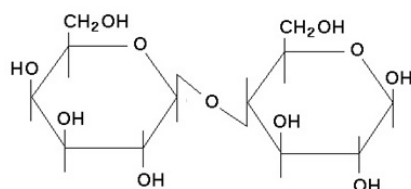


KUVIO 4. Sakkarooosin rakennekaava (Chem-Guide 2016).

2.2.1 Laktoosi

Maitosokeri eli laktoosi (kuvio 5) on nisäkkäiden maidossa esiintyvä disakkaridi, jonka molekyylikaava on $C_{12}H_{22}O_{11}$ ja molekyylipaino 342,296 g/mol. Laktoosissa glukoosimolekyyli on kiinnittynyt galaktoosimolekyyliin happisillalla. Elimistössä laktoosia muodostuu maitorauhasen epiteelisoluissa Golgin laitteissa, josta laktoosi kuljetetaan solujen ulkopuolelle kuljetusvesikkeleihin pakattuna. Äidinmaidosta saatava laktoosi on vastasyntyneelle tärkeä energianlähde ja ensimmäinen kosketus sokeriin ja makeaan. Laktoosia käytetään makeutusaineena ja lääketieteessä käymis- ja kasvualustana. Elimistössä laktaasientsyymi pilkkoo laktoosin katkaisemalla happisillan glukoosin ja galaktoosin väliltä. Perinnöllistä laktoosi-intoleranssia sairastavat ihmiset eivät pysty sulattamaan laktoosia, sillä heillä on hyvin vähän laktaasientsyymiä. Mikäli entsyymi puuttuu kokonaan, puhutaan tilasta nimellä hypolaktasia. Entsyymien määrä elimistössä

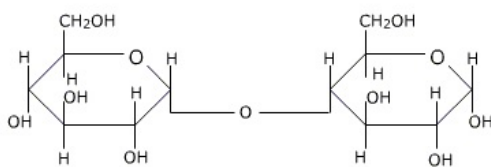
vähenee iän karttuessa, ja on arvioitu, että jopa 80 prosenttia maailman väestöstä kärsii laktoosi-intoleranssista. (Dansukker 2016.) Elintarvike on laktoositon, mikäli se sisältää korkeintaan 10 milligrammaa laktoosia 100 elintarvikegrammaa kohden. Vähälaktoositomuukselle vastaava luku on yksi gramma laktoosia 100 elintarvikegrammaa kohden. (Evira 2016.)



KUVIO 5. Laktoosin rakennekaava (Chem-Guide 2016).

2.2.2 Maltoosi

Maltoosin (kuvio 6) molekyylikaava on $C_{12}H_{22}O_{11}$ ja molekyylipaino 342,296 g/mol. Maltoosi tunnetaan mallassokerina, joka käy oluen valmistuksessa alkoholiksi. Tämän lisäksi maltoosia käytetään makeutusaineena ja joidenkin polysulfidien stabiloimisaineena. Maltoosi muodostuu kahdesta glukoosimolekyylistä ja on näin disakkaridi. Sitä syntyy tärkkelyksen hajotessa eläinten ruoansulatuskanavassa ja itävissä tärkkelyspitoisissa siemenissä, joissa amylaasientsyymi pilkkoo tärkkelyksen maltoosiksi. Elimistössä suolinesteen maltaasientsyymi pilkkoo maltoosin glukoosiksi. (Dansukker 2016.)



KUVIO 6. Maltoosin rakennekaava (Chem-Guide 2016).

2.3 Sokerit elintarvikkeissa

Sokeri on tunnettu makeudestaan ja se on jo aikojen alusta koettu mieluiseina makuna. Tämän epäillään johtuvan äidinmaidon makeudesta. Kun lapsi ensimmäisinä elinkautensa saa äidinmaitoa ja siinä olevaa laktoosia, koetaan se myös myöhemmin miellyttävänä makuna. Makeaa ei myöskään usein yhdistetä myrkyllisyyteen, toisin kuin esimerkiksi karvas maku. Makeuden aistimiseen vaikuttaa sokerin pitoisuus, nautittavan elintarvikkeen lämpötila, pH ja muut siinä olevat aineet. Sokerin makeuteen liittyy oleellisesti myös karamellisoituminen. Kuumennettaessa sokeria yli 100 °C, alkaa se hajota. Kun sokerimolekyylit hajoavat, reagoivat lopputuotteet toistensa, veden ja hajomattoman sokerin kanssa, jolloin syntyy vaalean ruskea makea massa (kuva 1). Karamellisoitumisen intensiteetti riippuu kuumennuslämpötilasta ja pH:sta. (Dansukker 2016.)



KUVA 1. Karamellisoituminen. Sokeri karamellisoituu, kun sitä lämmitetään yli 100 °C. Kerman kanssa lämmitettäessä karamellisoituneesta sokerista saadaan leivonnassa usein käytettyä kinuskikastiketta. (Kuva: R. Eloniemi 2016.)

Makeuden lisäksi sokerilla on paljon muitakin hyödyllisiä tehtäviä. Leivän leipomisessa sokeria käytetään parantamaan leivän tilavuutta ja rakennetta. Hiiva reagoi sokerin kanssa, jolloin entsyymit muuttavat sokerin alkoholiksi ja hiilidioksidiksi. Hiilidioksidi saa leivän kohoamaan ja lopullisesta tuotteesta tulee kuohkea. Mikäli hiiva käyttää kaiken sokerin kunnolla, ei valmiissa leivässä ole välttämättä lainkaan sokeria siinä muodossa, missä se taikinaan on lisätty. Jäätelöön lisättynä sokerin tehtävä on alentaa jäätelön jäätymispistettä. Tämä saa jäätelön säilymään pehmeänä ja syömäkelpoisena suoraan pakastimestakin otettuna. Sokeri myös estää suurien jääkiteiden muodostumisen jäätelön pinnalle. Mitä suurempi sokeripitoisuus elintarvikkeessa on, sitä alhaisempi on sen jäätymispiste. Jäätymispisteen alenemisen suuruus riippuu molekyylien määrästä

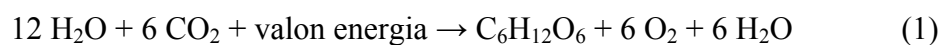
painoyksikköä kohden, jonka vuoksi esimerkiksi glukoosi ja fruktoosi ovat parempia jäätympisteiden alentajia kuin sakkaroosi. (Dansukker 2016.)

Marjoja säilöittäessä lisätään pinnalle usein vähän sokeria, koska sillä on säilövä ja kosteuttava vaikutus elintarvikkeisiin. Kun pitoisuus on tarpeeksi korkea, sokeri estää mikrobien kasvun sitomalla riittävästi vettä itseensä niin, että vettä ei jää mikrobien kasvuun. Liuennut sokeri taas kasvattaa osmoottista painetta, joka puolestaan heikentää mikrobien kasvumahdollisuuksia. (Dansukker 2016.)

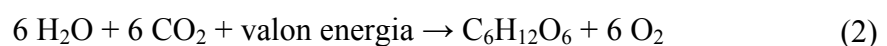
Paistamisessa ja leivonnassa on usein kyse Maillardin reaktiosta. Maillardin reaktiossa elintarvikkeen sokerin karbonyyliryhmä reagoi aminohappojen aminoryhmän kanssa tuottaen veden lisäksi epästabiilia glykosyyliamiinia. Tästä puolestaan muodostuu ke-toosiamiineja, jotka esimerkiksi tuottavat ruskeita typpipitoisia polymeereja. Maillardin reaktio on siis osallisena lihan pinnan ruskistamisessa ja esimerkiksi leivän pinnan saamiseksi vaalean ruskeaksi. (Tareke ym. 2002.)

2.4 Fotosynteesi

Energian säilymislain mukaan energia ei katoa, vaan se muuttaa muotoaan. Fotosynteesi eli yhteyttäminen muuttaa auringon valon kemialliseksi energiaksi, eli sokeriksi, hapeksi ja vedeksi. Fotosynteesin reaktioyhtälö on esitetty reaktioyhtälössä 1. (Campbell & Reece 2008, 187.)



Koska reaktioon käytetään vettä, mutta siinä myös syntyy vettä, voidaan reaktioyhtälöä yksinkertaistaa hieman. Tämä muoto on esitetty reaktioyhtälössä 2. (Campbell & Reese 2008, 187.)



Kaksivaiheinen fotosynteesiprosessi tapahtuu kasvien soluissa olevissa kloroplasteissa. Kloroplastien yhteyttämiskalvoilla tapahtuvat valoreaktiot, joissa vesimolekyyli hajoaa ja auringon valon energia pelkistää NADP^+ -molekyyliä NADPH-muotoon. Reaktiossa syntyy sidotun kemiallisen energian lisäksi happea, joka vapautuu solusta. Pimeäreaktiot eli Calvinin sykli tapahtuu kloroplastien kalvojen välitilassa, jossa valoreaktiossa tuotetun energian avulla sidotaan hiilidioksidia ja pelkistetään se. Pimeäreaktioiden lopputuotteena syntyy sokeria, joka voidaan vapauttaa solusta tai säilöä sokerit soluun varastotäkkelyksenä. (Garrett & Grisham 2005, 675; Campbell & Reece 2008, 188-189.)

2.5 Energiatuotanto

Lähes kaikki eliöt saavat energiansa hiilihydraateista ja sokereista. Lisäksi ihmisen aivot tarvitsevat sokeria toimiakseen tehokkaasti. Glukoosimetabolian ensimmäinen vaihe on glykolyysi, jossa glukoosi hapetetaan vaiheittain kahdeksi pyruvaatiksi. Glykolyysi on kymmenen entsymaattisen reaktion ketju (taulukko 1), joka tapahtuu kaikilla eliöillä sytoplasmassa. Kyseessä on tarkkaan säädelty anaerobinen prosessi, joka tuottaa vain vähän energiaa. Suurin osa energiasta on kiinni edelleen pyruvaatissa, joka täytyy käsitellä edelleen energian saattamiseksi eliön käyttöön. Glykolyysi tuottaa energiaa yhteensä kaksi adenosiinitrifosfaattia eli ATP:tä, kaksi nikotiiniamididinukleotidia eli NADH:ta sekä kaksi pyruvaattia. (Garrett & Grisham 2005, 580.)

TAULUKKO 1. Glykolyysin eteneminen kymmenen reaktion kautta (Garrett & Grisham 2005, 580).

Nro	Reaktio	Lähtöaine	Entsyymi	Lopputuote
1	Fosforylaatio	Glukoosi	Heksokinaasi	Glukoosi-6-fosfaatti
2	Isomerisaatio	Glukoosi-6-fosfaatti	Glukoosifosfaatti-isomeraasi	Fruktoosi-6-fosfaatti
3	Fosforylaatio	Fruktoosi-6-fosfaatti	Fosfofruktokinaasi	Fruktoosi-1,6-bisfosfaatti
4	Leikkaus	Fruktoosi-1,6-bisfosfaatti	Aldolaasi	Dihydroksiasetonifosfaatti + D-glyseraldehydi-3-fosfaatti
5	Isomerisaatio	Dihydroksiasetonifosfaatti	Trioosi-isomeraasi	D-glyseraldehydi-3-fosfaatti
6	Hapetus	Glyseraldehydi-3-fosfaatti	Glyseraldehydi-3-fosfaattihydrogenaasi	1,3-bisfosfoglyseraatti
7	Fosfaattiryhmän siirto	1,3-bisfosfoglyseraatti	Fosfoglyseraattikinaasi	3-fosfoglyseraatti
8	Isomerisaatio	3-fosfoglyseraatti	Fosfoglyseromutaasi	2-fosfoglyseraatti
9	Dehydraatio	2-fosfoglyseraatti	Enolaasi	Fosfoenolipyruvaatti
10	Fosfaattiryhmän siirto	Fosfoenolipyruvaatti	Pyruvaattikinaasi	Pyruvaatti

Pyruvaatin jatkokäsittelylle on monta mahdollisuutta. Aerobisissa olosuhteissa se voidaan käsitellä sitruunahappokierron ja oksidatiivisen fosforylaation avulla. Sitruunahappokierto eli Korelosin sykli tapahtuu mitokondrion matriksissa ja sitä tapahtuu lähes kaikissa eukaryoottisoluissa. Sitruunahappokierron säätelyreaktiossa pyruvaatti muutetaan asetyylikoentsyymi-A:ksi. Koentsyymissä oleva asetyyliryhmä hapetetaan hiilidioksidiksi monessa vaiheessa, jotta energia saataisiin mahdollisimman tehokkaasti talteen. Sitruunahappokierto on kaikkien tärkeimpien energialähteiden hapetuksen yhteinen loppuvaihe, jossa suurin osa hiilidioksidista vapautuu. Koentsyymit hapetetaan kierroksen jälkeen oksidatiivisessa fosforylaatiossa, jolloin niihin sitoutuneesta energiasta saadaan valmistettua ATP:tä. Sitruunahappokierto tuottaa myös materiaalia moniin orgaanisten yhdisteiden synteesiin. (Garrett & Grisham 2005, 609.)

Anaerobisissa olosuhteissa käsittely tapahtuu maitohappo- tai alkoholikäymisen avulla. Molemmissa tapauksissa NADH täytyy ensin hapettaa NAD^+ -muotoon, jotta koko

energiatuotanto voi jatkua. Maitohappokäymisessä pyruvaatti pelkistyy maitohapoksi eli laktaatiksi NADH:n hapettuessa. Etanolikäyminen puolestaan on kaksivaiheinen reaktio, jossa pyruvaatti dekarboksyloidaan asetaldehydiksi, joka puolestaan pelkistyy etanoliksi NADH:n hapettuessa. Anaerobinen metabolia ei kuitenkaan ole energiatuotannon kannalta tehokkain vaihtoehto, sillä glukoosin hapetus ilman happea ei voi edetä hiilidioksidiksi saakka. Tästä johtuen suurin osa energiasta jää kiinni laktaattiin tai etanoliin. Täydellisellä aerobisella hapetuksella energiaa voidaan tuottaa yhdestä glukoosimolekyylistä yhteensä 38 ATP:tä, kun anaerobisissa oloissa vastaava luku on 2 ATP:tä. (Garrett & Grisham 2005, 598.)

Elimistössä glukoosi varastoidaan maksaan ja lihaksiin glykokeeninä, joka hajotetaan glykogenolyysin avulla, kun elimistö tarvitsee ylimääräistä energiaa. Maksan glykogeeni hajotetaan verenkiertoon verensokerin nostamiseksi, kun taas lihasten glykogeeni hajotetaan lihasten käyttöön. Lihasten glykokeenivarastoja ei voi käyttää verensokerin nostamiseen. Glykokeenivarastojen täytyttyä sokeri varastoituu rasvaksi elimistöön, mikä pitkällä aikatahtaimella aiheuttaa painon nousua. (Garrett & Grisham 2005, 598.)

Glykolyysille käänteinen tapahtuma on glukoneogeneesi, joka tarkoittaa glukoosin synteesiä pyruvaatista ja on suoraan käänteinen reaktioreitti glykolyysille. Glukoneogeneesissä käytetään glykolyysin reversiibeileitä reaktioita. Sivulla 16 taulukossa 1 irreversibelit reaktiot 1, 3 ja 10 korvataan toisilla, sillä irreversiibeli reaktio ei voi edetä energetisesti kuin yhteen suuntaan. Reversiibeli reaktio voi puolestaan edetä molempiin suuntiin. Elimistössä tapahtuva Corin sykli yhdistää glukoneogeneesin ja glykolyysin toisiinsa. Lihaksissa glykolyysissä tuotettu laktaatti päättyy verenkiertoon ja se kuljetetaan maksaan, jossa glukoneogeneesi muuttaa sen takaisin glukoosiksi. Glukoosi puolestaan voidaan kuljettaa lihaksiin verenkierron mukana tai varastoida glykokeeninä. (Garrett & Grisham 2005, 705.)

3 IONIKROMATOGRAFIA

Kromatografiassa näytteen komponentit erotetaan toisistaan kolonnin tai levyn avulla ja analyyttien pitoisuudet määritetään. Erottuminen tapahtuu kahden toisiinsa liukenemattoman faasin välillä. Näytteen molekyylit tarttuvat matkalla kolonniin tai levyyn, joka hidastaa niiden liikettä. Molekyyleistä ja kromatografiamenetelmästä riippuen tietyt molekyylit tarttuvat useammin kiinni kuin toiset, jolloin näiden useasti kiinnittyvien molekyyliden matka kolonnissa tai levyllä kestää kauemman kuin niiden, jotka tarttuvat vain harvoin. (Jaarinen & Niiranen 2005, 140-141.)

Ionikromatografia on nestekromatografian menetelmä, joka on tarkoitettu anionien ja kationien analysointiin vesiliuoksesta. Kolonnin pinnalla olevassa stationäärifaasissa on sähköisesti varattuja kohtia, joihin vastakkaisen varauksen omaavat analyytit tarttuvat. Liikkuvana faasina toimii neste eli eluentti. Myös analyytin liukoisuus eluenttiin vaikuttaa analyytin erottumisnopeuteen. (Jaarinen & Niiranen 2005, 141; Fritz & Gjerde 2009, 1-2.)

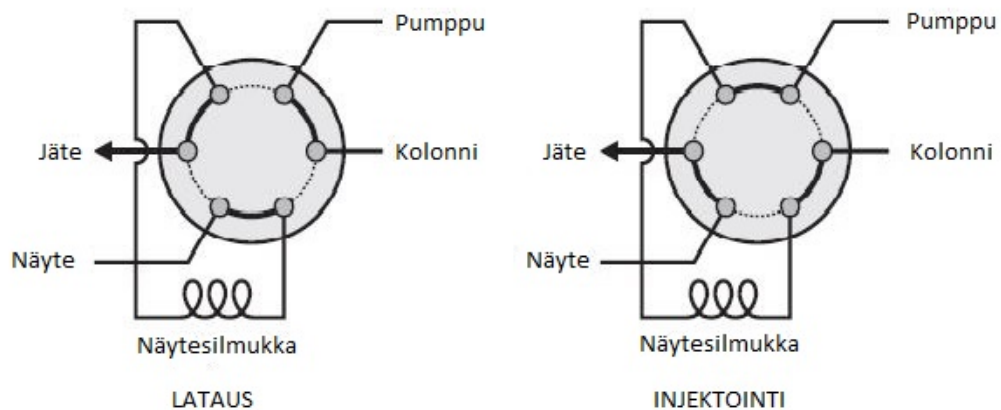
3.1 Ionikromatografian toiminta

Ionikromatografialaitteisto eli IC koostuu useasta osasta, joilla jokaisella on tarkka paikka ja tarkoitus systeemissä ja näytteen analysoinnissa. Jokainen IC sisältää näytteen syöttäjän (kuva 2). Näytteen syöttäjässä on injektointineula, joka injektoidaan näytteen näytekuppeista ja siirtää sen injektorin kautta systeemiin. Näytekuppien koko ja muoto riippuvat näytteen syöttäjästä. (SeQuant 2007; Fritz & Gjerde 2009, 5.)



KUVA 2. Näytteen syöttäjä (kuva: Eloniemi, R. 2016).

Neula injektioi näytteen injektoriin, jolla on kaksi asentoa, lataus ja injektointi. Nämä injektointiasennot on havainnollistettu kuviossa 7. Neulan injektoidessa näytettä injektori on latausasennossa. Tällöin näyte virtaa neulasta näytesilmukkaan, kun samanaikaisesti pumppu pumpkaa eluenttia, joka virtaa injektorin ohitse suoraan kolonniin ja siitä systeemiä eteenpäin. Kun näytesilmukka on täyttynyt, kääntyy injektori injektointiasentoon, jolloin eluentti virtaa näytesilmukkaan ja kuljettaa silmukassa olleen näytteen mukanaan systeemiin. Silmukan tilavuutta muuttamalla voidaan vaikuttaa näytteestä otetun otoksen laajuuteen. (SeQuant 2007; Fritz & Gjerde 2009, 6.)



KUVIO 7. Injektorin lataus- ja injektointiasennot sekä niiden erot havainnollistettu kuvina. (SeQuant 2007, muokattu.)

Ionikromatografian pumppu voi olla isokraattinen tai gradienttipumppu. Isokraattista pumppua käytetään, kun halutaan tasaisella konsentraatiovirtauksella pumpata tiettyä eluentikonsentraatiota linjastoon. Gradienttipumpulla taas pystytään vaihtamaan eluen-

tin konsentraatiota kesken ajon useitakin kertoja, sillä se sekoittaa veden ja eluentin annetussa suhteessa automaattisesti ajo-ohjelman mukaisesti. (SeQuant 2007; Fritz & Gjerde 2009,17.)

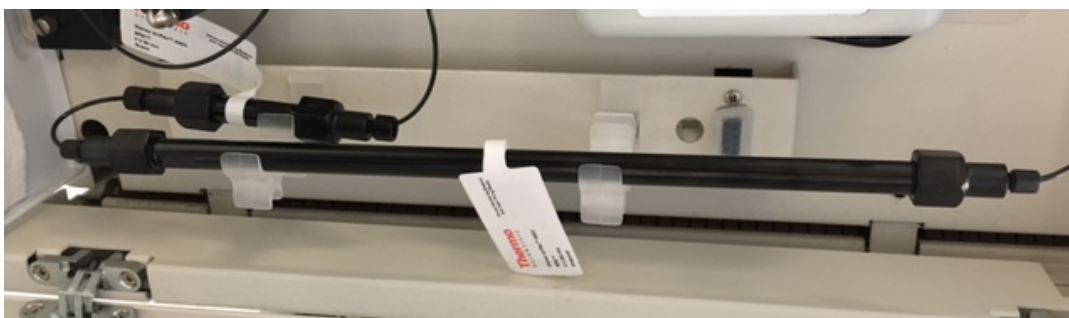
Eluentti on suolaliuos, jota pumpataan koko systeemin läpi. Vaikka erotuskolonne onkin ionien pääasiallinen erottaja, osallistuu myös eluentti ionien erottamiseen. Eluentin tarkoitus on myös toimia puskurina ja pitää pH tasaisena koko matkan aina injektorilta detektorille saakka. Eluentin pH vaikuttaa ionien eluointijärjestykseen, ja siksi eri eluenteilla ionit tulevat detektorille eri järjestyksessä. Pienillä muutoksilla voidaan saada suuriakin muutoksia aikaan määrittelyn kannalta, sillä esimerkiksi lämpötilaa nostamalla ioninvaihto stationäärifaasin ja mobiilifaasin toimivan kolonnin välillä nopeutuu. Virtausta muuttamalla voidaan saada kaikki ionit detektorille nopeastikin, mutta tämä voi vaikuttaa ionien erottumiseen. (SeQuant 2007; Fritz & Gjerde 2009,17.)

Ionikromatografiassa yleisimmin käytetty eluentti on karbonaattiliuos, jossa on karbonaatin lisäksi vetykarbonaattia. Karbonaattipohjaisen eluentin vahvuuksia ovat sen selektiivisyys sekä ionivahvuuden muuttaminen optimaaliseksi retentioajoille. Karbonaattipohjaisen eluentin pH on noin 4, koska supressorissa muodostuu hiilihappoa H_2CO_3 . Alhaisen pH:n vuoksi vahvoiksi hapoiksi muutetut analyytit, esimerkiksi kloridi, erottuvat täysin. Heikkojen happojen erottuminen on huonompaa pH:n vuoksi. Ne erottuvat vain noin 20 prosenttisesti. (SeQuant 2007; Thermo Fisher Scientific 2016.)

Toinen paljon käytetty eluentti on hydroksidieluentti, joka valmistetaan mahdollisimman puhtaasta, 50 tilavuusprosenttista natrium- tai kaliumhydroksidiliuoksesta. Hydroksidieluentin etuja ovat sen muuttuminen vedeksi supressorissa sekä jatkuvasti erittäin matala taustakohina. Matalan taustakohinan säilyttämiseksi eluentti täytyy kuitenkin suojata ilmalta esimerkiksi typpikaasulla. Tämä estää määrittystä häiritsevän karbonaatin synnyn eluentissa. Hydroksidipohjaisen eluentin pH on noin 12, mikä vaikuttaa suuresti esimerkiksi kolonnin valintaan. Kaikki kolonnit eivät kestä näin korkeita pH-arvoja. Lisäksi eluentti täytyy valmistaa muovipulloihin, sillä vahvat emäkset liuottavat lasista silikaattia, mikä puolestaan aiheuttaa paljon taustakohinaa. (SeQuant 2007; Thermo Fisher Scientific 2016.)

Eluentti kuljettaa näytteen esikolonnille, jonka virtaussuunta on yleensä asetettu varsinasta erotuskolonnin vasten. Esikolonnissa käytetty materiaali on sama kuin erotusko-

lonnissa. Sen tehtävä on suojata kallista erotuskolonnia suurimmilta epäpuhtauksilta sekä määrittystä häiritseviltä tekijöiltä. Vasta varsinainen erotuskolonne erottaa näytteen ionit toisistaan. Kuvassa 3 on esitetty esikolonne ja erotuskolonne kytkettynä ionikromatografialaitteistoon. Kaikille kolonneille yhteistä on, että ne sisältävät varauksellisia funktionaalisia ryhmiä joita kutsutaan ioninvaihtoryhmiksi. Anioneja eroteltaessa nämä ryhmät ovat positiivisesti varattuja ja sisältävät kvaternäärisen ammoniumyhdisteen. Kvaternäärisessä ammoniumyhdisteessä yksi ketjuista on hiiliketju, joka on kovalenttisesti sidoksella kiinni pohjamateriaalissa. Kolme jäljelle jäävää ryhmää voivat olla kaikki erilaisia, esimerkiksi metyyliryhmiä. Erotuskolonnin toiminta perustuu eri ionien erilaiseen sidospysyvyyteen niiden ollessa vuorovaikutuksessa ioninvaihtoryhmien kanssa. Ensimmäisenä ulos kolonnista tulevat siis ne ionit, jotka muodostavat heikkoja sidoksia ja viimeisenä vahvimman sidoksen muodostaneet ionit. (SeQuant 2007; Fritz & Gjerde 2009, 14-15.)



KUVA 3. Esikolonne ja erotuskolonne laitteistoon kytkettynä (kuva: R. Eloniemi 2016). Esikolonnin virtaussuunta asetettu vasemmalle, kun erotuskolonnin virtaussuunta oikealle.

Erotuskolonneja on monenlaisia ja sen valitsemiseen vaikuttavat esimerkiksi menetelmässä käytettävä eluentti sekä laitteiston osat. Lisäksi valinnassa on tärkeää kolonnin selektiivisyys, ionien erotuskapasiteetti sekä hyötysuhde ja tehokkuus. Kahdessa erotuskolonnien päätyypissä suurin ero on pohjamateriaalilla. Pohjamateriaalina on käytetty joko epäorgaanista silikaa tai orgaanista polymeeria. Silikapohjaiset erotuskolonnit on tarkoitettu sellaiseen anioninvaihtosysteemiin, jossa ei ole supressoria. Supressoiduissa systeemeissä pH on usein hyvin korkea, noin 10-12. Silikapohjaiset kolonnit eivät kestä, mikäli pH on pitkään yli 7,5. Polymeeripohjaisia kolonneja on markkinoilla paljon erilaisia ja ne kestävätkin huomattavasti emäksisempiä olosuhteita kuin silikapohjaiset kolonnit. Useimpia polymeerikolonneja voidaan käyttää myös hydroksidieluentin

kanssa, jolla on karbonaattieluenttia vielä hieman korkeampi pH. (SeQuant 2007; Fritz & Gjerde 2009, 15.)

Kolonniin jälkeen näyte jatkaa matkaansa eluentin mukana supressorille. Yksi esimerkiksi supressorista on esitetty kuvassa 4. Supressoria ei käytetä kaikissa systeemeissä, mutta esimerkiksi vesianalytiikassa sillä on erittäin hyödyllinen rooli, sillä se vaimentaa taustakohinaa ja vahvistaa saatuja signaaleja. Yleisimmin ionien havaitsemiseen käytetään johtokykyä ja sen muutosta. Koska eluentit sisältävät itsessään paljon suoloja ja niillä on korkea johtokyky, täytyy eluentin johtokyky poistaa eli supressoida. Supressori ei vaikuta kaikkeen taustakohinaan, kuten esimerkiksi detektorin aiheuttamaan vähäiseen kohinaan, pumpun epätasaisesta virtauksesta johtuvaan kohinaan tai lämpötilan vaihtelusta aiheutuvaan kohinaan. (SeQuant 2007; Fritz & Gjerde 2009, 16.)



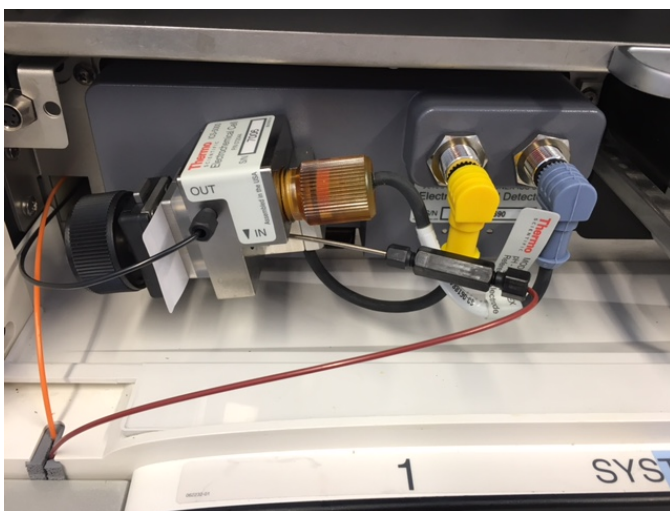
KUVA 4. Yksi supressorityyppi ionikromatografialaitteistoon kytkettynä (kuva: Elo-niemi, R. 2016).

Supressorista ionit kulkeutuvat detektorille, jossa ionit tunnistetaan ja niiden määrä analysoidaan. Johtokykydetektori kaikista yleisin detektorimalli koska kaikki ionit johtavat sähköä. Johtokykydetektorissa eluentti virtaa virtauskyvetin läpi, jossa on mallista riippuen kaksi tai neljä elektroodia, joiden välillä vallitsee jännite. Kun näytteen ionit saavuttavat kyvetin, nousee kennon sisällä olevan liuoksen kyky johtaa sähköä. Sähkönjohtokyvyn nousu on suoraan verrannollinen ionin konsentraation kanssa ja jokaiselle ionille on spesifinen johtokyky. (SeQuant 2007; Fritz & Gjerde 2009, 17.)

3.2 Hiilihydraattianalytiikka ionikromatografilla

Elektrokemiallinen detektori voi olla esimerkiksi amperometrinen. Amperometriseen detektoriin yhdistetään elektrokemiallinen kenno (kuva 5). Kennossa on työelektrodi,

jonka materiaali voi olla kultaa, hopeaa tai platinaa riippuen määritettävästä analyytistä. Hiilihydraattianalytiikassa käytetään kultaelektrodia. Elektrokemiallinen detektio koostuu kolmesta eri vaiheesta. Ensimmäisenä analyytti adsorboituu elektrodin pinnalle, jonka jälkeen analyytistä riippuen se joko hapettuu, eli luovuttaa elektroneja elektrodille tai pelkistyy eli vastaanottaa elektroneja. Viimeisessä vaiheessa analyytti emittoituu pois elektrodin pinnalta. Havaitsemiseen käytetään hiilihydraattien tuottamaa sähkövirtaa niiden hapettuessa kultaelektrodin pinnalla. (Dionex 2000; Limbert 2011; Corradini ym. 2012.)



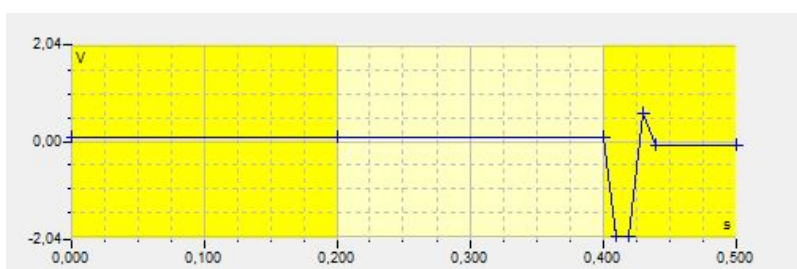
KUVA 5. Harmaaseen elektrokemialliseen detektoriin kytketty elektrokemiallinen kenno, joka sisältää kultaelektrodin (kuva: R. Eloniemi 2016).

Elektrokemiallinen detektio on erittäin herkkä menetelmä määrittää tiettyjä analyytteja. Sen positiivisiin puoliin kuuluu sen tarkkuus ja spesifisyys, sillä vain tietyt yhdisteet hapettuvat ja pelkistyvät tietyissä olosuhteissa. Jännitettä ja pH-arvoa muuttamalla saadaan eri analyytit reagoimaan työelektrodilla. Muut aineet eivät anna detektorille mitään vastetta, tai antavat hyvin pienen vasteen, jota ei kromatogrammissa näe. (Waters 2007; Corradini ym. 2012; Eicom USA 2016.)

Elektrokemiallista detektiota on käytetty melko vähän, sillä aiemmin ongelmana on ollut kultaelektrodin puhdistus ja kuluminen. Koska elektrodin pinnalla tapahtuu paljon hapettumista ja pelkistymistä, tulee pinta nopeasti likaiseksi ja se vaatii puhdistuksen hiomalla jo muutaman näytteen jälkeen. Tämä puhdistus ja sen laatu aiheuttavat ajon sisälläkin eroja mittaustarkkuuteen ja tuloksiin, jonka vuoksi tulokset eivät ole luotettavimpia mahdollisia. (Dionex 2000; Limbert 2011; Eicom USA 2016.)

Korkean erotuskyvyn anioninvaihtokromatografiaa yhdistettynä pulssitettuun amperometriseen detektioon, eli HPAE-PAD -menetelmää käytetään sellaisten anionisten analyttien erottamiseen, jotka ovat perusmuodoltaan anionisia tai jotka voidaan ionisoida korkeissa pH-arvoissa. Tämän vuoksi menetelmässä käytetään eluenttina hydroksidiliuosta korkeassa pH:ssa, jotta saadaan anionit erottumaan myös sellaisista aineista, joissa neutraaleissa olosuhteissa analyytti ei olisi anioninen. Korkea pH takaa myös sen, että neutraalit tai kationiset analyytit eivät jää kolonniin vaan eluoituvat liuoksen mukana. Menetelmän ja etenkin eluentin käyttö vaatii metallivapaan polymeeripohjaisen kromatografialaitteiston ja polymeerihartsin, joka ei ole huokoinen. (El Rassi 1995, 291; Dionex 2011.)

Pulssitettuun amperometrinen detektori tarkoittaa elektrodin puhdistusta käyttämällä hyväksi jännitteen aaltomuotoa, jolloin ajon aikana jännite vaihtuu useita kertoja (kuvio 8). Kun elektrodi on ladattu, tapahtuu analyytin detektointi elektrodin pinnalla. Elektrodin puhdistusvaiheessa jännite laskee nollassa ensin negatiiviseksi, jolloin elektrodin pinta puhdistuu. Tämän jälkeen jännite nousee ensin nollassa yläpuolelle ja laskee sitten takaisin nollassa entisöidäkseen elektrodin pinnan takaisin käyttökuntoiseksi. Tämä puhdistusprosessi kestää vain millisekunteja ja tapahtuu jatkuvasti ajon aikana. PAD-menetelmän ansiosta kultaelektrodin pinta on jatkuvasti puhdas ja mittaustulokset ovat luotettavia ja toistettavia. (Tareke ym. 2002; Thermo Fisher Scientific 2013; Dionex 2016.)



KUVIO 8. Esimerkki jännitteen aaltomuodosta. Tummankeltaisella alueella elektrodi puhdistetaan ja entisöidään, vaaleankeltaisella alueella tapahtuu jännitteen mittausta. (kuvio: Eloniemi, R. 2016)

4 MENETELMÄN VALIDOINTI

4.1 Validoinnin tavoite

Validoinnin tavoite on selvittää menetelmän soveltuvuus haluttuun mittaukseen sekä mahdolliset häiriötekijät ja niiden vaikutus viranomaisvaatimukset huomioon ottaen (MIKES 2005, 25). Validoinnissa menetelmän soveltuvuutta laitteelle ja tietyille näytematriiseille arvioidaan useiden ennalta määritettyjen parametrien avulla. Useimmin arvioidut parametrit ovat lineaarisuus, mittausalue, tarkkuus, määrittäysraja ja mittaus-epävarmuus. (Jaarinen & Niiranen 2005, 30; Bliesner 2006, 3.) Validoinnin avulla selvitetään menetelmän kyky tuottaa oikeita ja vertailtavissa olevia tuloksia. Mikäli menetelmä on standardoitu, voi validointi olla sisällöltään suppeampi kuin standardoimattomassa menetelmässä. Validointi sisältää aina validointisuunnitelman, kokeiden suorittamisen, tulosten tilastollisen arvioinnin sekä dokumentoinnin ja raportoinnin. (Bliesner 2006, 2-3; Witick 2015, 1.)

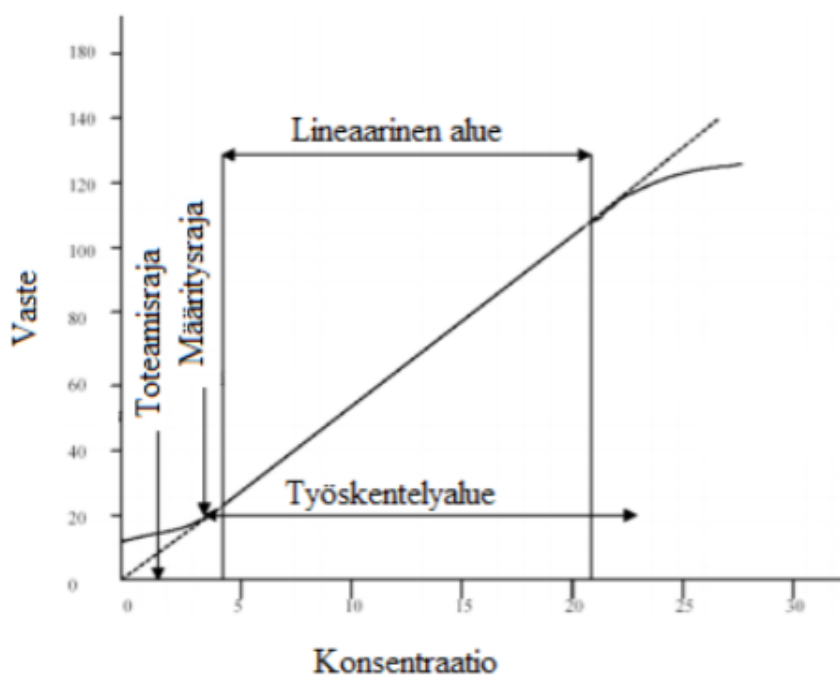
Validointi suoritetaan aina kalibroidulla laitteella ja pitkällä aikavälillä, jolloin ympäristön vaikutukset tulee myös otettua huomioon. Validoinnista saatuja tuloksia valvotaan säännöllisesti ja mikäli tarve vaatii, voidaan validointi suorittaa uudelleen. Validointi tulee aina suorittaa uudelleen, mikäli menetelmän käyttöönottoa laajennetaan uudelle näytematriisille, manuaalisesta menetelmästä siirrytään automatisoituun menetelmään, mittauslaitteistossa tapahtuu oleellisia muutoksia tai uusi menetelmä otetaan käyttöön. (MIKES 2005, 26; Witick 2015, 2.)

4.2 Validoinnissa käytetyt parametrit

4.2.1 Lineaarisuus ja mittausalue

Lineaarisuusaluetta tutkittaessa etsitään alue, jolla analyytin antaman vasteen tulos on suoraan verrannollinen analyytin pitoisuuteen eli kuvaaja on suora. Lineaarisuutta määritettäessä tulee mitattavia kalibrointistandardeja olla vähintään viisi ja ne mitataan useasti tulosten varmistamiseksi. (MIKES 2005, 28.) Lineaarista aluetta voidaan pitää hy-

väksyttävänä, kun saadun suodan korrelaatiokerroin on vähintään 0,999 (Green 1996, 307). Korrelaatiokertoimen lisäksi lineaarista aluetta voidaan arvioida silmämääräisesti vastekäyrästä. Kalibrointisuora saadaan useasti suoraan laitteelta, jolloin laite on myös määrittänyt korrelaatiokertoimet suorille. Kuviossa 9 on esitetty mittaustulosten antama käyrä sekä siihen merkitty lineaarisuusalue. Lineaarisuusalue on rajattu niin, ettei kalibrointikäyrä lähde vielä kaartumaan, vaan on selkeästi suora lineaarisuusalueen sisällä. (MIKES 2005, 28-29; Huber 2010, 20.)



KUVIO 9. Lineaarisuuden määrittäminen kalibrointikäyrästä (MIKES 2005, 29, muokattu).

Mittausalue määritetään, kun tunnetaan lineaarisuusalue. Mittausalueen virhe on tunnettu ja se pysyy tietyissä spesifioituissa rajoissa, jolloin mittausalueella saavutetaan hyväksyttävä tarkkuus. Yleensä mittausalue on hieman lineaarista aluetta suurempi. Mittausalueen määrittämiseen voidaan käyttää näytteitä, joiden pitoisuus tunnetaan ja niiden perusteella arvioidaan suoran pysyvyyttä lineaarisena. Mittaustulosten perusteella tehdään päätös luotettavasta mittausalueesta. (Jaarinen & Niiranen 2005, 13; MIKES 2005, 28-29.)

4.2.2 Toteamisraja ja määrittäysraja

Toteamisraja c_{LOD} on se alin analyytin pitoisuus, joka voidaan luotettavasti todeta ja erottaa nollanäytteestä. Rajaa määritettäessä tulee ottaa huomioon pitoisuuden suuruus, sillä sen pitää olla niin suuri, ettei vasteen voida enää katsoa johtuvan taustan vaihtelusta. Toteamisraja, joka lasketaan yhtälön 1 avulla, määritetään nollanäytteen vasteiden keskiarvoon lisäämällä kolminkertainen nollanäytteiden keskihajonta. (Jaarinen & Niiranen 2005, 13; MIKES 2005, 29-30.)

$$c_{LOD} = x + 3 \cdot s \quad (1)$$

missä

x = nollanäytteen keskiarvo

s = nollanäytteen tulosten keskihajonta

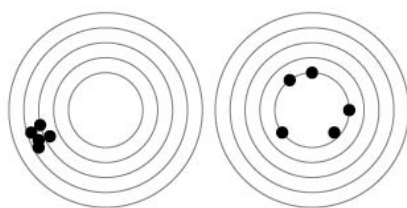
Määrittäysraja eli kvantitointiraja c_{LOQ} on luotettavasti mitattu analyytin pienin pitoisuus näytteessä. Kvantitointiraja poikkeaa toteamisrajasta jättäen niiden väliin niin sanotun harmaan alueen. Tällä harmaalla alueella analyytin olemassaolo voidaan luotettavasti todentaa, mutta sen pitoisuuden määrittämiseen liittyy huomattava epävarmuus. Määrittäysraja voidaan laskea esimerkiksi kolminkertaisen toteamisrajan avulla (yhtälö 2). (Jaarinen & Niiranen, 2005 13; MIKES 2005, 30.)

$$c_{LOQ} = 3 \cdot c_{LOD} \quad (2)$$

4.2.3 Tarkkuus ja oikeellisuus

Tarkkuus kuvaa kuinka hyvin mitattu arvo ja todellinen arvo sopivat yhteen. Se kertoo myös mittauslaitteen kyvystä antaa vastetta, joka vastaa todellista arvoa. Tarkkuuden mittaamiseen tulisi käyttää useita konsentraatioiltaan erilaisia näytteitä, joista jokaista mitataan vähintään yhdeksän kertaa. (Green 2012, 40.) Sekä systemaattinen virhe että satunnaisvirhe vaikuttavat tarkkuuteen, jonka vuoksi sekä mittauksen oikeellisuuden arviointi että toistotarkkuuden tutkiminen vaikuttavat menetelmän tarkkuuteen. (Jaari-

nen & Niiraen 2005, 12; MIKES 2005, 35.) Tarkkuus voi merkitä sisäistä tarkkuutta tai ulkoista tarkkuutta. Ulkoisesti tarkan mittaustuloksen tulos on lähellä todellista arvoa ja sitä voidaan näin ollen tutkia, kun tunnetaan todellinen arvo etukäteen. Jos mittausten keskihajonta on erittäin pieni, on mittaus sisäisesti tarkka. Tällöin mittauksien rinnakkaismääritykset ovat aina lähes samat. Usein mittaus on sisäisesti tarkka, mutta ulkoinen tarkkuus kärsii, tai päinvastoin. Tarkkuutta on havainnollistettu kuviossa 10. (MIKES 2005, 35.)



KUVIO 10. Tarkkuus. Vasemmalla puolella on sisäisesti tarkka, mutta ulkoisesti epätarkka mittaus. Oikealla puolella on ulkoisesti tarkka mittaus, joka kuitenkin on sisäisesti epätarkka. (MIKES 2005, 35, muokattu.)

Tarkkuuden arvioinnin yhteydessä lasketaan näytteille suhteellinen keskihajonta eli RSD %. Suhteellinen keskihajonta lasketaan yhtälöllä 3. Tarkkuutta voidaan pitää erinomaisena, mikäli saadaan alle viiden prosentin hajonta ja hyvänä, mikäli tuloksena saadaan alle 10 prosentin hajonta.

$$RSD \% = \frac{s}{x} \cdot 100 \quad (3)$$

missä

x = näytteiden keskiarvo

s = näytteiden keskihajonta

Jaarisen ja Niirasen (2005, 12) mukaan mittauksen oikeellisuus kuvaa yhtäpitävyyttä mittaustulosten keskiarvon ja todellisen arvon välillä. Mittauksen oikeellisuuden arviointiin on monia tapoja. Laboratorio voi esimerkiksi osallistua laboratorioden välisiin vertailumittauksiin tai käyttää tunnetun vertailumateriaalin lisäystä stabiiliin näytteeseen. Oikeellisuuden määrittäminen sisältää vertailumateriaalien useat analysoinnit rinnakkaisnäyttein, analyyttien konsentraation määrittämisen näistä rinnakkaisnäytteistä ja oikeellisuuden lopullisen laskemisen. (MIKES 2005, 35-36.)

4.2.4 Toistettavuus ja uusittavuus

Toistettavuutta mitattaessa on olosuhteiden pysyttävänä vakiona. Tämä tarkoittaa sitä, että menetelmä, laite, tekijä ja muut mahdolliset tekijät pysyvät samana mittausten tapahtuessa lyhyen aikavälin sisällä. Toistettava menetelmä on täsmällinen ja peräkkäiset mittaustulokset ovat paikkaansa pitäviä. Vaihtelun suuruus on näytesarjan sisällä pienempi kuin niiden välillä hajonnan ollessa yleensä suurempi sarjojen välillä. Eron kasvaessa huomattavan suureksi on sen syy selvitettävä, sillä toistettavuutta mitattaessa esimerkiksi lämpötilan, esikäsittelymenetelmän ja sen eri osien tulisi pysyä muuttumattomina. Eri henkilön suorittaessa menetelmä, on kyse menetelmän uusittavuuden määrittämisestä. Uusittavuuden mittaukset suoritetaan yleensä myös pidemmällä aikavälillä, kuin toistettavuuden mittaukset. (Jaarinen & Niiranen 2005, 12; MIKES 2005, 37.)

4.2.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuuden laskeminen on tärkeä osa validointiprosessia, sillä on tärkeää tietää, missä kohdassa analyysiketjua epävarmuustekijät ovat suurimmillaan. Mittausepävarmuuksia voidaan arvioida useilla eri menetelmillä. Menetelmän valintaan vaikuttaa esimerkiksi analyysimenetelmän tyyppi. (Näykki ym. 2013, 47.)

Helpoin tapa laskea mittausepävarmuus on käyttää Measurement Uncertainty kit- eli MUKit –ohjelmistoa. MUKit on Suomen Ympäristökeskus SYKEN laatima laskentaohjelmisto, jota laboratoriot voivat hyödyntää laadukkaan validoinnin yhteydessä. MUKit-ohjelma helpottaa mittausepävarmuuksien arviointia ja sen avulla voidaan mittausepävarmuuden laskemiseen hyödyntää kontrollinäytteiden lisäksi rutiininäytteiden rinnakkaistuloksia, saantokokeiden tuloksia ja laboratorioden välisiä vertailukoetuloksia. Mittausepävarmuus voidaan laskea laitekohtaisen mittausepävarmuuden lisäksi kokonaismittausepävarmuutena, mutta tämä edellyttää näytteenottoprosessin ja siihen vaikuttavien epävarmuustekijöiden vahvaa tuntemusta. (Näykki ym. 2013, 18-19; Suomen ympäristökeskus 2016.)

5 POHDINTA

Tässä opinnäytetyössä oli tavoitteena validoida menetelmä sokerien määrittämiseksi ionikromatografilla elintarvikenäytteistä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää ja validoida menetelmä, jolla pystyttäisiin analysoimaan luotettavasti glukoosi, fruktoosi, sakkaroosi, laktoosi ja maltoosi samasta ajosta. Lisäksi tarkoituksena oli saavuttaa määritysrajoissa Eviran asettamat rajat laktoosittomalle tuotteelle ja alittaa ne. Opinnäytetyöhön kuului kattava validointiprosessi, millä voidaan todistaa laitteiston ja menetelmän soveltuvuus sokerimääritykselle. Validoitaviin parametreihin kuului määritysraja, lineaarisuus, stabiilisuus, tarkkuus, toistettavuus, uusittavuus sekä mittausepävarmuus.

Opinnäytetyössä kehitettiin toimiva menetelmä viiden eri sokerin määrittämiselle elintarvikenäytteistä. Kaikki sokerit saatiin erottumaan selkeästi niin pohjaviivasta kuin toisistaankin. Piikkien muoto ja korkeus olivat hyviä ja niiden retentioajat stabiileja. Menetelmää testattaessa ja validoitaessa on referenssinäytteinä käytetty monipuolisesti erilaisia näytematriiseja edustavia näytteitä, jonka vuoksi menetelmää voidaan pitää luotettavana useimpien elintarvikkeiden sokeripitoisuuden määrittämiseksi. Käytettyjä näytematriiseja olivat maitotuotteet, mehut ja muut juomat, suklaat sekä kastikkeet. Menetelmä nopeutui menetelmäkehityksen edetessä, ja alkutilanteen 50 minuuttia kestänyt mittaus oli validoinnin aikana enää 26 minuuttia.

Suurin menetelmään liittyvä epävarmuus liittyy näytteen esikäsittelyyn. Koska itse menetelmän kehittäminen ja laitteen optimointi menetelmälle veivät aikaa odotettua huomattavasti enemmän, ei näytteen esikäsittelylle jäänyt aikaa. Tulevaisuudessa olisi hyvä testata eri näytteenkäsittelymenetelmiä ja niistä saatavia tuloksia. Lisäksi testauksen kohteena voisi olla erilaisille näytteille optimoidut näytteenkäsittelymenetelmät, sillä esimerkiksi kiinteät näytteet kuten juusto tai ruisleipä eivät reagoi näytteenkäsittelymenetelmään samalla tavalla, kuin juoksevammat näytteet. Proteiinien saostukseen käytettyjen Carrez-reagenssien määrän optimointi on myös mahdollinen tutkimuksen kohde.

Ennen opinnäytetyötä laktoosi on määritetty elintarvikkeista spektrofotometrisesti. Opinnäytetyössä käytetty näytteen esikäsittelymenetelmä perustuu spektrofotometrisen määrittämis menetelmän esikäsittelyyn. Esikäsittelyyn oli tarvittavat reagenssit ja se osattiin jo ennestään suorittaa muun laboratoriohenkilökunnan toimesta, joten uuden opeteltavan asian määrä väheni. Vanhat näytteet ovat olleet pääasiassa laktoosittomia, mutta elintar-

vikelakiuudistuksen myötä on näytemäärien oletettu kohoavan. Spektrofotometrinen määrittäminen on entsyymaattiseen reaktioon perustuva mittaus, joka vaatii sen suorittajalta tarkkaa sarjapipetointia sekä jatkuvaa näytteen käsittelyä ja käsin mittausta. Opinnäytetyön ansiosta laktoosi neljän muun sokerin ohella on mahdollista määrittää ilman pipetoinnista aiheutuvaa virhettä. Lisäksi näytteen analysointi nopeutuu ja automatisoituu, jolloin mittauksen tekijä voidaan vapauttaa mittauksen ajaksi muihin laboratorion töihin. Optimaalisen tehokkuuden kannalta sokerimäärittäminen ionikromatografisesti parantaa tehokkuutta, mutta myös toistettavuutta ja tarkkuutta.

Itse validoinnissa Eviran asettamaan laktoosittomuuden rajaun päästiin helposti, eikä laktoosittomuuden määrittäminen tuota laitteistolla ongelmia. Myös muilla sokereilla päästiin todella alhaisiin määrittämissrajoihin, jolloin voidaan analysoida myös vähähiilihydraattisia elintarvikkeita. Määrittämissrajoja ja raportointirajoja tutkittaessa otettiin huomioon laitteiston ja sen osien kulumisen tulevaisuudessa. Käytännössä raportointirajoja siis nostettiin hieman määrittämissrajasta, että voidaan olla varmoja tulosten oikeellisuudesta myös pidemmän ajan kuluttua. Ainoastaan sakkaroosilla raportointiraja jätettiin määrittämissrajan tuntumaan, sillä määrittämissraja oli samaa luokkaa pienimmän standardin kanssa.

Kaikkien sokereille saatiin myös kalibrointisuorat, joiden korrelaatiokerroin oli vähintään 0,999. Glukoosin kalibrointisuora oli toisen asteen yhtälö sen selvän kaartumisen vuoksi. Tämä ei kuitenkaan aiheuta toimenpiteitä, sillä käytetty ohjelmisto osaa ottaa toisen asteen yhtälön huomioon kalibroinnin ja tulosten laskennan yhteydessä. Fruktosi, sakkaroosi, laktoosi ja maltoosi olivat selkeästi lineaarisia, ja niille saatiin hyvät kalibrointisuorat. Mittausaluetta ei haluttu lähteä laajentamaan yli lineaarisen alueen, sillä piikkien muoto alkoi kärsiä nopeasti. Tämä lisää mittausepävarmuutta etenkin tulevaisuudessa osien kuluessa ja vanhetessa. Mittausalueen alaosa kuitenkin tarkistettiin ja kaikkien sokerien osalta mittausalueen voidaan todeta alkavan nolasta.

Menetelmä ja laite todettiin erittäin stabiiliksi kaikkien muiden sokerien osalta, maltoosin osalta vain stabiiliksi. Yli vuorokauden kestävässä ajossa retentioajat liukuivat hieman myöhemmäksi. Ongelma ei kuitenkaan ollut suuri ja tuli näkyviin vasta erittäin pitkissä ajoissa. Tulevaisuudessa tätä on hyvä seurata lisäämällä ajon väliin ja loppuun kontrollinäytteitä, joilla pystytään varmentamaan mittaus-taso sekä piikkien paikka. Myös piikkien muotoa on hyvä seurata läpi koko ajon.

Tarkkuusmittausten perusteella menetelmän voidaan todeta olevan sisäisesti erittäin tarkka RSD-prosenttien ollessa hyvin pieniä. Menetelmän toistettavuus on kontrolloinnäytteillä mitattuna neljällä ensimmäisellä sokerilla erittäin hyvä, maltoosilla hyvä. Referenssinäytteitä tarkasteltaessa menetelmän toistettavuuden voidaan todeta olevan erittäin hyvä kaikilla tarkastelussa olleilla näytematriiseilla.

Menetelmänkehitysvaiheessa laitteen ominaisuudet ja sen toiminta olivat tarkan seurannan alla. Jokaisen osan liike, koko ja paikka pyrittiin optimoimaan parhaan tuloksen saamiseksi. Tämä kuitenkin vei paljon aikaa itse validoinnilta. Tästä syystä menetelmän uusittavuutta ei testattu. Uusittavuus olisi syytä testata mahdollisimman nopeasti validointiprosessin jälkeen. Menetelmän kuitenkin uskotaan olevan uusittava, sillä viikon aika suoritettujen mittaustulokset eivät poikkea toisistaan ja laitteen on todettu pysyvän stabiilina.

Validoinnin viimeisenä parametrina määritettiin menetelmälle mittausepävarmuus. Mittausepävarmuus laskettiin siihen spesifoidulla Mukit –ohjelmistolla sekä tunnettujen kontrolliliuosten että referenssinäytteistä mitattujen pitoisuuksien avulla. Menetelmän mittausepävarmuudet olivat laboratorion asettamien rajojen alapuolella. Laskettu mittausepävarmuus koski kuitenkin vain laitteistoa ja sille kehitettyä menetelmää. Jatkossa voitaisiin tutkia myös kokonaismittausepävarmuutta etenkin yhdistettynä näytteiden esikäsittelymenetelmien testaukseen.

Mikäli menetelmään halutaan vielä jatkossa lisätä kuudes sokeri, galaktoosi, vaatii se vielä enemmän laitteen ja menetelmän testausta sekä mahdollisesti oman ajo-ohjelman luomista. Galaktoosin piikki tulee hyvin lähellä sakkaroosin piikkiä ja niiden erottaminen samassa ajossa voi olla hankalaa. Menetelmää on kuitenkin ehditty testata vielä vasta vähän, joten mahdollisuudet kuuden sokerin yhtäaikaiseen määrittämiseen samasta näytteestä on olemassa.

Validoinnin tuloksia voidaan pitää luotettavana, sillä niihin on otettu mittaustuloksia huomattavasti suosituksia laajemmista ajoista. Ajoja on suoritettu pitkällä aikavälillä ja esimerkiksi eri päivinä valmistetuilla eluenteilla. Menetelmä on esitetty akkreditoitavaksi lokakuun 2016 lopussa olevassa laboratorion akkreditoinnissa. Vaikka menetelmää ei ole standardoitu, ovat menetelmäkehityksen ja validoinnin tulokset hyväksyttä-

viä ja kaikki päätökset menetelmän suhteen perusteltuja. Lisäksi validointiin voidaan lisätä uusittavuuden tulokset ennen akkreditointipäivää. Näin ollen Nablabs Oy saa akkreditoidun menetelmän sokerien määrittämiseksi elintarvikenäytteistä ionikromatografi.

LÄHTEET

Bliesner, D. M. 2006. Validating chromatographic methods. A practical guide. Hoboken: Wiley-interscience.

Campbell, N., & Reece, J. 2008. Biology. 8. painos. San Francisco: Benjamin Cummings.

Chem-Guide. 2016. Carbohydrates. Luettu 14.9.2016. <http://chem-guide.blogspot.fi/2010/04/carbohydrates.html>

Corradini, C., Cavazza, A. & Bignardi, C. 2012. High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications. 2012.

Dansukker. 2016. Sokerilla on monta tehtävää. Luettu 22.8.2016. <http://www.dansukker.fi/fi/tietoa-sokerista/sokerilla-on-monta-tehtavaa.aspx>

Dansukker. 2016. Sokeri syntyy luonnossa. Luettu 22.8.2016. <http://www.dansukker.fi/fi/tietoa-sokerista/sokeri-syntyy-luonnossa.aspx>

Dionex. 2000. ED50 Electrochemical detector operator's manual. Thermo Fisher Scientific. Päivitetty 1.4.2000. Luettu 25.8.2016. [PDF]. <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4530-31673-01.pdf>

Dionex. 2011. Product manual CarboPac PA20. Thermo Fisher Scientific. Luettu 30.7.2016. [PDF]. <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4378-Man-031884-05-CarboPac-PA20-Jul11.pdf>

Dionex. 2006. ICS-3000 Ion Chromatography System. Päivitetty 15.06.2006. Luettu 22.9.2016. [PDF]. http://www.dionex.com/en-us/webdocs/25859-ICS-3000_DataSheet_V30_releasedJC061506.pdf

Dionex. 2016. High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. Thermo Fisher Scientific. Päivitetty 29.7.2016. Luettu 13.8.2016. <http://www.dionex.com/en-us/products/ion-chromatography/ic-rfic-solutions/hpae-pad/lp-111613.html>

Eicom USA. 2016. Electrochemical Detection (ECD) Fundamentals, Details. Eicom USA. Luettu 5.8.2016. <https://www.eicomusa.com/hplc-ecd/electrochemical-detection-ecd-fundamentals/details/>

El Rassi, Z. 1995. Carbohydrate analysis. High Performance liquid Chromatography And Capillary Electrophoresis. Elsevier Science B.V.

Evira. 2016. Yleiset pakkausmerkinnät. Päivitetty 6.7.2016. Luettu 15.7.2016. <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/valmistus-ja-myynti/elintarvikkeista-annettavat-tiedot/pakkausmerkinnat/>

Evira. 2016. EFSA on julkaissut lausunnon laktoosin raja-arvoista laktoosi-intoleranssissa ja galaktosemiassa. Päivitetty 14.3.2016. Luettu 20.9.2016.

<https://www.evira.fi/yhteiset/ajankohtaista/efsa-on-julkaissut-lausunnon-laktoosin-raja-arvoista-laktoosi-intoleranssissa-ja-galaktosemiassa/>

Fritz, J. S. & Gjerde, D. T. 2009. Ion Chromatography. 4. painos. Weinheim: Wiley-VCH.

Garrett, Reginald H. & Grisham, Charles M. 2005. Biochemistry. 3. painos. Thomson.

Gonza'lez, A. G. & Herrador, M. 2007. A Practical Guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. Trends in analytical Chemistry 26(3), 227-238.

Green, C. 2012. Northwest Regulatory Support. Analytical Method Validation. A Step-by-Step Approach to Establishing a Method Validation Program.

Evira. Ravintoarvomerkinnot pakollisiksi. Muokattu 31.3.2016. Luettu 25.7.2016.

<https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/pakkausmerkinnat/ravintoarvomerkinnot/>

Huber, L. 2010. Validation of Analytical Methods. Agilent Technologies. Luettu 31.8.2016. [PDF]. <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf>

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita Prima Oy.

Lehtonen, P.O. & Sihvonen, M-L. 2004. Laboratorion analyttinen kemia. Opetushallitus. Edita Prima Oy.

Limpert, G. 2011. The Power of Pulsed Amperometric Detection Coupled With Chromatography for Analyzing Carbohydrates. American Laboratory. Julkaistu 1.10.2011. Luettu 5.8.2016. <http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/35296-The-Power-of-Pulsed-Amperometric-Detection-Coupled-With-Chromatography-for-Analyzing-Carbohydrates/>

Mahkonen, Mia. 2008. Fruktoosin valmistus Suomessa täyttää 40 vuotta. Kehittyvä Elintarvike – Elintarvikealan tiede- ja ammattilehti 03/2008. Luettu 13.9.2016.

MIKES. 2005. Metrologian neuvottelukunta. Kemian ja mikrobiologian jaosto. Kemian metrologian opas.

Nablab. Nablab lyhyesti. Luettu 25.7.2016.

http://www.nablab.fi/yritys_nablab_lyhyesti.php

NMKL. 1993. Fruktoosi, glukoosi ja sakkaroosi. Nestekromatografinen määrittäminen hedelmä- ja kasvitutotteista. Päivitetty. 5.11.1993. Luettu 29.7.2016.

NMKL. 2006. Laktoos och galaktos. Enzymatisk bestämning i livsmedel. 2. painos. Päivitetty 2006. Luettu 2.10.2016.

Näykki, T., Kyröläinen, H., Witick, A., Mäkinen, I., Pehkonen, R., Väisänen, T., Sainio, P. & Luotola, M. 2003. Suomen ympäristökeskus. Ympäristöhallinnon ohjeita 4/2013. Laatusuositukset ympäristöhallinnon vedenlaaturekistereihin vietävälle tiedolle: vesistä

tehtävien analyysittien määrittämisrajat, mittausepävarmuudet sekä säilytysajat ja –tavat. [PDF].

https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/40920/OH_4_2013.pdf?sequence=1

Päällysaho, T. 2013. Analyysimenetelmän kehittämisen toimintamalli. Centria ammattikorkeakoulu. Kemiantelekniiikan koulutusohjelma.

Rohrer, J. 2013. Analysis of Carbohydrates by High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD). Thermo Fisher Scientific. Luettu 10.08.2016. [PDF]. <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/5023-TN-20-Analysis-Carbohydrates-HPAE-PAD-TN70671-EN.pdf>

SeQuant. 2007. A Practical Guide to Ion Chromatography. An introduction and troubleshooting manual. SeQuant. Luettu 1.8.2016. [PDF].

http://nestgrp.com/pdf/Zp1/Sp1/ION_Manual.pdf

Suomen ympäristökeskus. 2016. Mittausepävarmuusohjelmisto (MUKit). Julkaistu 30.5.2013. Päivitetty 20.1.2016. Luettu 31.8.2016. http://www.syke.fi/fi-fi/Palvelut/Kalibrointipalvelut_ja_sopimuslaboratorio/MUKit_mittausepavarmuusohjelma

Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. & Törnqvist, M. 2002. Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. Journal of agricultural and food chemistry –lehti 7/2002, 50.

Thermo Fisher Scientific. 2013. Carbohydrate analysis with HPAE-PAD. Thermo Fisher Scientific. Muokattu 22.7.2013. Luettu 29.7.2016. [PDF]. http://www.dionex.com/en-us/webdocs/114769-BR-HPAE-PAD-Carbohydrate-Analysis-BR700910_E.pdf

Thermo Fisher Scientific. 2016. CarboPac PA1 kolonni. Käyttöohje. Thermo Fisher Scientific. Luettu 25.7.2016.

Turunen, Seppo. 2007. Biologia: Ihminen. 5.-7. painos. WSOY.

Waters. 2007. Waters 2465 Electrochemical Detector Operator's Guide. Waters. Luettu 21.8.2016. [PDF].

<http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500246502rb.pdf>

Witick, A. 2015. Nablabs Oy. Menettelytapaohje J-6-001. Analyysimenetelmien validointi. Päivitetty 23.10.2015.

Witick, A. 2015. Nablabs Oy. Menettelytapaohje J-6-005. Mittausepävarmuuden ja määrittämisrajan arviointi. Päivitetty 12.8.2016.